

auxina produziram média de 5,05 nós/explante, com adição de AIB, média de 4,67 e com adição de ANA, média de 4,36 nós/explante. Ocorreu um aumento na taxa média do número de nós/explante nesse período. No meio de cultura contendo AIB combinado com BAP a $5,0\mu\text{M.l}^{-1}$ formou-se 5,59 nós por explante.

TABELA 9 – Número médio de nós/explante em brotações de *Cedrela fissilis*, obtidas no cultivo inicial, primeiro e segundo subcultivo em meio de cultura WPM complementado com BAP a diferentes concentrações, associado ou não com AIB ou ANA na concentração de $0,5\mu\text{M.l}^{-1}$.

Presença de auxina	Tempo (dias)		
	30	60	90
Sem Auxina	2,12 a	3,61 a	5,05 a
AIB ($0,5\mu\text{M}$)	2,12 a	3,03 b	4,67 a
ANA ($0,5\mu\text{M}$)	3,32 a	2,92 b	4,36 a

Níveis do fator com médias seguidas por mesma letra não diferem pelo teste de Tukey (5%).

As doses de BAP mostraram um efeito cúbico nas avaliações feitas aos 30 e 60 dias. No último subcultivo, o efeito das doses de BAP foi linear nos meios de cultura independentemente da adição de auxina (Figura 16).

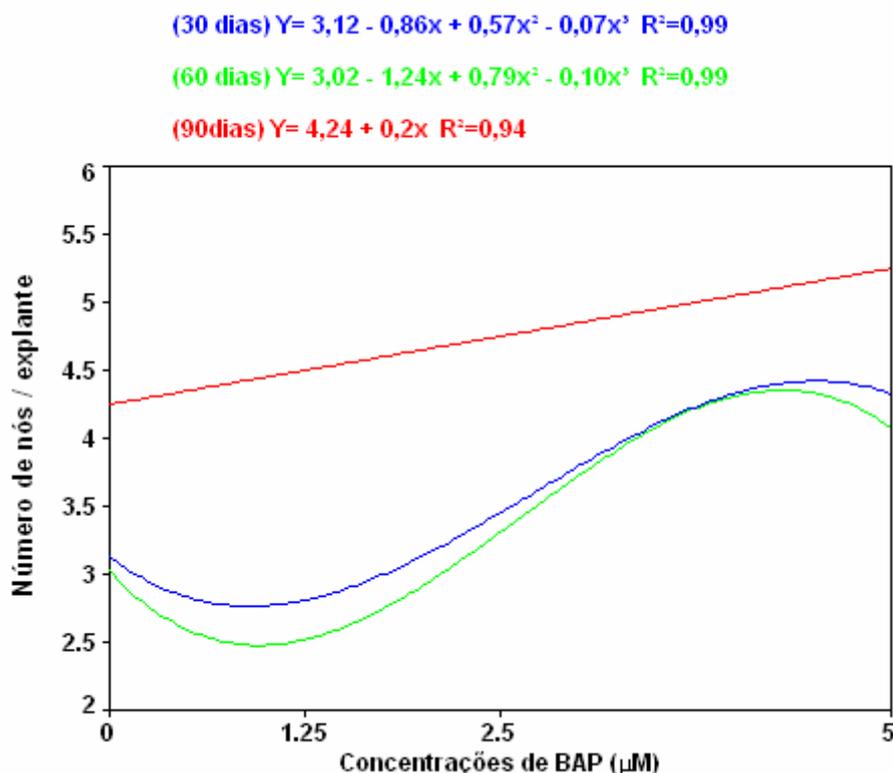


Figura 16 – Número de nós/explante de *Cedrela fissilis* em meio WPM complementado com BAP a diferentes concentrações, associado ou não com AIB ou ANA na concentração de $0,5\mu\text{M.L}^{-1}$, obtidas aos 60 e 90 dias de cultivo.

O comprimento médio das brotações de cedro diferiu aos 30 dias de cultivo. Os tratamentos com ANA mostraram ser os mais eficientes para esse parâmetro, com um comprimento médio de 0,86 cm, diferindo a 5% de probabilidade de erro dos tratamentos contendo AIB (0,79 cm) e dos tratamentos sem adição de auxina (0,78 cm) respectivamente. Não houve interação entre as doses de BAP utilizadas e a adição da auxina ao meio e, essa citocinina não apresentou efeito no comprimento médio das brotações para os meios adicionados ou não de auxina.

Aos 60 dias de cultivo, não houve diferença significativa entre os tratamentos contendo ou não auxina, porém o meio contendo ANA apresentou a maior média no comprimento de brotações (0,95 cm), seguido do meio sem adição de auxina e do meio contendo AIB. Referente às concentrações de BAP, estas não possuíram efeito para esse parâmetro analisado aos 60 dias, nos diferentes meios de cultura, independentemente da adição de auxina.

Aos noventa dias de cultivo, ocorreu efeito quadrático das concentrações de BAP no meio de cultura, independentemente da adição de auxina. O comprimento médio das brotações foi de 1,14 cm a uma concentração de $1,25 \mu\text{M.l}^{-1}$ de BAP, sendo que, nas concentrações maiores de BAP ($2,5$ e $5,0 \mu\text{M.l}^{-1}$) o comprimento médio de brotações foi menor ($1,08$ e $0,97$ cm). Skoog & Miller (1957) afirmam que citocininas apesar de induzirem brotações múltiplas, possuem propriedades que podem anular o efeito de alongamento de brotações adventícias. Segmentos de nós cotiledonares e de epicótilo de cedro cultivados em meios MS e WPM, após 30 dias alcançaram a melhor elongação com comprimento de $1,1$ - $1,7$ cm. Nunes *et al.*, (2002).

Nos tratamentos em que ocorreu adição de BAP ao meio de cultura, a proliferação de calos foi observada na base do explante e, em alguns casos, na base das gemas axilares, como pode ser visto na Figura 17.

A formação de calos na base dos explantes mostrou ser diretamente proporcional à adição de citocinina, sendo que, quanto maior a concentração de BAP adicionado ao meio, maior a porcentagem da formação destes que, ocorreu de forma diferenciada quanto ao tamanho, de acordo com a combinação de fitorreguladores utilizados. Nos tratamentos contendo BAP a $5\mu\text{M.l}^{-1}$ combinado com ANA ou AIB, ocorreu a iniciação de calos na base dos explantes que, posteriormente se expandiu pelo hipocótilo (Figura 17). Nos meios sem adição de BAP, não ocorreu a formação de calos, apenas raízes adventícias. A formação de raízes ocorreu também em alguns tratamentos juntamente com a formação de calos na base do explante, porém, em menores taxas.

O aumento da concentração da citocinina foi acompanhado pelo aumento do percentual de calos proliferados até a concentração de $2,5\mu\text{M.l}^{-1}$, sendo que, além dessa concentração, a porcentagem começa a estabilizar (Figura 18). Perrando, (2003), utilizando segmentos nodais para multiplicação *in vitro* de *Acacia mearnsii*, obteve formação de calos na base dos explantes quando os meios B5, WPM e MS foram suplementados de BA e AIB. Em segmentos do nó cotiledonar de cedro, cultivados *in vitro*, Nunes *et al.*, (2002) relata que ocorreu proliferação de calos na base e nas ramificações axilares do explante.

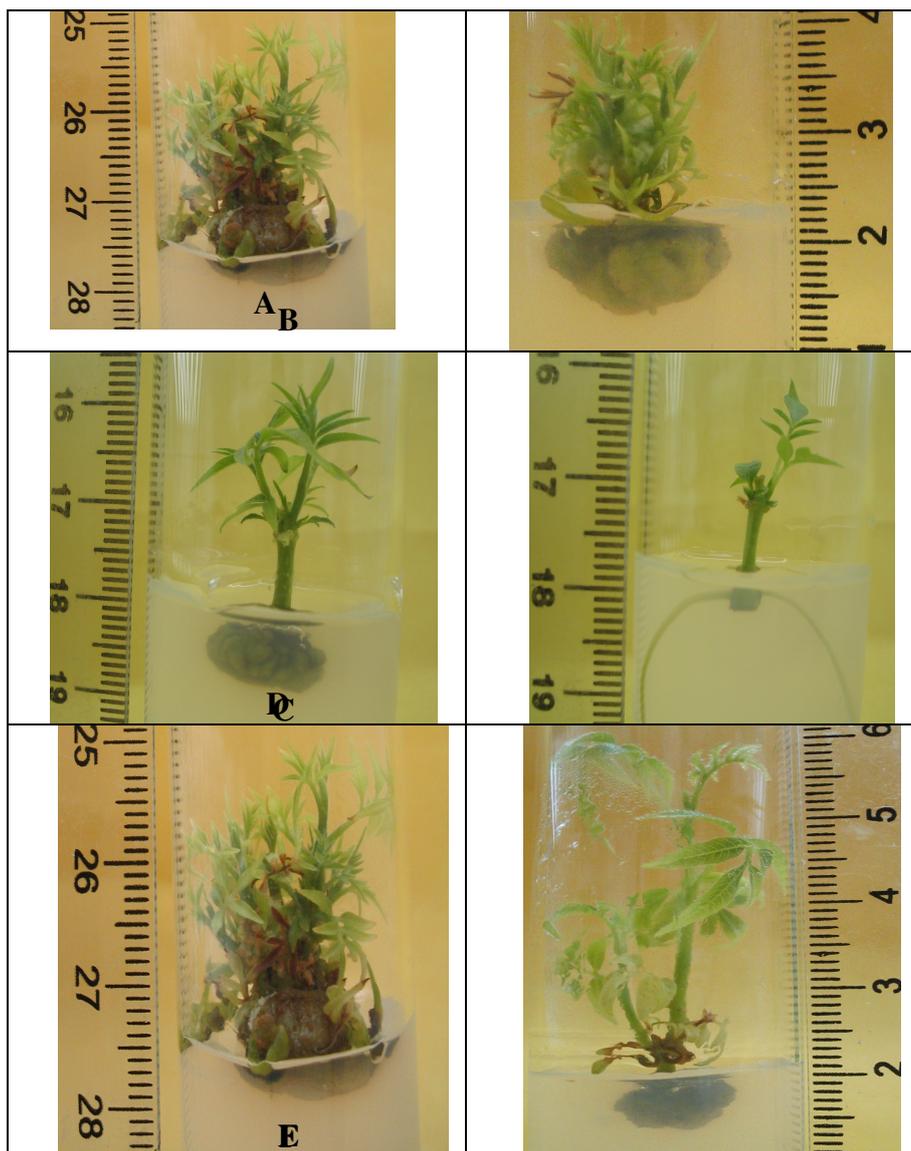


FIGURA 17 **A e E** – Brotações do nó cotilédonar (30 dias) em meio de cultura WPM, suplementado com BAP ($5,0\mu\text{M.L}^{-1}$) mais AIB ($0,5\mu\text{M.L}^{-1}$); **C** – Brotações (30 dias) em meio WPM suplementado com BAP ($1,25\mu\text{M.L}^{-1}$); **E** – Brotações (60 dias) em meio WPM mais ANA ($0,5\mu\text{M.L}^{-1}$), **B** – Brotações do nó cotilédonar (60 dias) em meio de cultura suplementado com BAP ($2,5\mu\text{M.L}^{-1}$).

A porcentagem de formação de raízes foi influenciada pela concentração de BAP presente no meio de cultura, em que a concentração da citocinina mostrou ser

inversamente proporcional à taxa de formação (Figura 18). A análise de variância mostrou que aos 30 dias de cultivo, a formação de raízes foi influenciada pela presença de auxina ao meio de cultura. Os tratamentos com adição de ANA diferiram significativamente, a um nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey, dos tratamentos sem a presença de auxina, onde a formação de raízes ocorreu em 78% na presença de ANA sem adição de BAP e 24% quando adicionado de $1,25\mu\text{M.l}^{-1}$ dessa citocinina.

O meio de cultura testemunha apresentou uma média de 52% de explantes que formaram raízes, enquanto que o meio contendo AIB, apresentou 80% de formação de raízes quando livre de citocinina e, 16% quando adicionado de $1,25\mu\text{M.l}^{-1}$. Silva *et al.*, (2002) verificaram a ocorrência de enraizamento de *Ananas comosus* L. na ausência de BAP, enquanto que, com o aumento das concentrações da citocinina no meio de cultura, ocasionou uma redução do número de raízes.

$$(30 \text{ dias}) Y = 8,56 + 86,53x - 31,65x^2 + 3,52x^3 \quad R^2=0,99$$

$$(60 \text{ dias}) Y = 5,55 + 104,47x - 39,46x^2 + 4,36x^3 \quad R^2=0,99$$

$$(90 \text{ dias}) Y = 4,05 + 93,52x - 31,84x^2 + 3,27x^3 \quad R^2=0,99$$

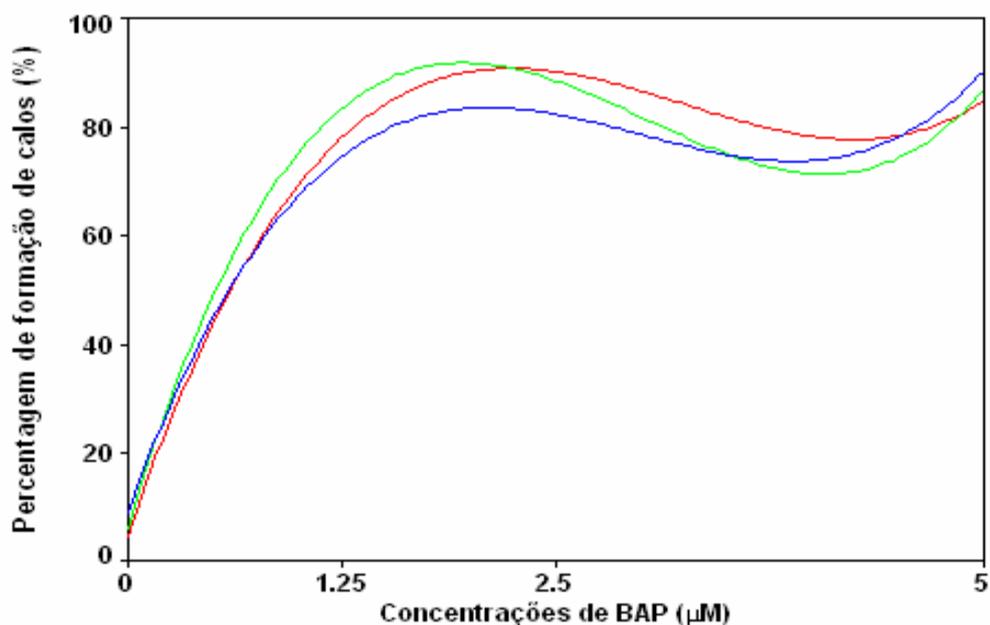


FIGURA 18 – Efeitos dos tratamentos com BAP, combinados ou não com AIB ou ANA, na formação de calos em brotações de *Cedrela fissilis*, obtidas no cultivo inicial, primeiro e segundo subcultivo partindo do hipocótilo de sementes germinadas *in vitro*.

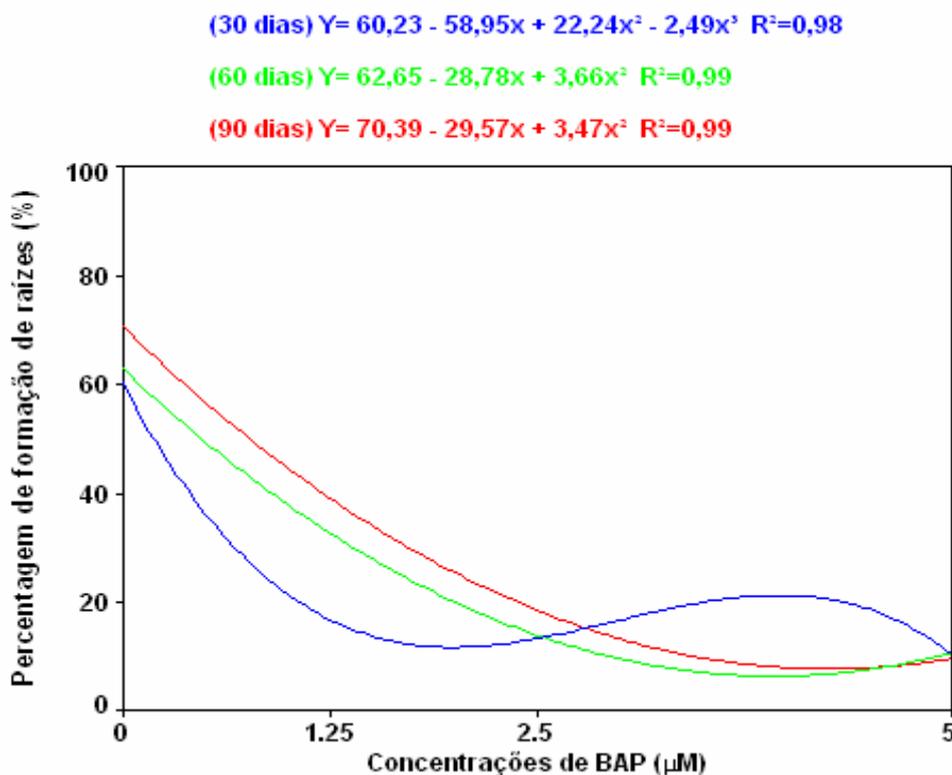


FIGURA 19 – Efeitos dos tratamentos com BAP, combinados ou não com AIB ou ANA, na formação de raízes em brotações de *Cedrela fissilis*, obtidas no cultivo inicial, primeiro e segundo subcultivo partindo do hipocótilo de sementes germinadas *in vitro*.

Quando o objetivo for o enraizamento dos explantes, a adição de fitorreguladores, que não sejam auxinas, é desnecessária ou mesmo prejudicial (Grattapaglia & Machado, 1998).

Dos tratamentos testados, constatou-se que, no cultivo inicial e no primeiro subcultivo, realizado aos 60 dias, a regeneração média de brotações foi baixa e a indução de brotações múltiplas foi dependente da presença de BAP, no meio de cultura. De uma maneira geral, a presença de 0,5µM de AIB ou ANA, combinada com BAP não interferiu significativamente nas taxas médias de regeneração de brotações de cedro, apesar de que, aos 90 dias de cultivo, o melhor resultado foi obtido em meio de cultura com AIB combinado com 5µM.l⁻¹ de BAP.

Brotações apicais de mudas de dois anos de idade de peroba rosa regeneraram brotações axilares desde o cultivo inicial, ao contrário de brotações oriundas do epicótilo que apresentam um incremento no número médio de brotações

apenas no segundo subcultivo. Isso provavelmente se deveu ao nível de fitorreguladores endógenos nos diferentes tipos de explantes (Ribas, 1998). De acordo com Muruyama *et al.* (1989), a micropropagação de *Cedrela odorata*, partindo de explantes juvenis, foi possível cultivando-os em meio WPM, adicionado de $1,25\mu\text{M.l}^{-1}$ de BAP. O número médio de nós formados por explante foi diretamente proporcional ao número médio de brotações por explante e com o comprimento médio de brotações formadas.

O comprimento médio de brotações de cedro foi aumentado pela auxina ANA a uma concentração de $0,5\mu\text{M.l}^{-1}$. Nos cultivos aos 30 e 60 dias, a citocinina utilizada não mostrou efeito no comprimento das brotações, porém, aos 90 dias de cultivo, a média de comprimento foi maior a $0\mu\text{M.l}^{-1}$ de BAP. Os resultados mostram que o comprimento de brotações foi inversamente proporcional ao número médio de brotações formadas e número de nós/explante. Efeitos residuais de citocininas causam ainda o encurtamento dos caules, o que dificulta a individualização das plantas e o processo de enraizamento.

O alongamento dos eixos caulinares e a redução dos efeitos residuais das citocininas, podem às vezes, ser obtidos com a utilização de reguladores de crescimento do grupo das giberilinas e auxinas como também de carvão ativado (Debergh & Read, 1991).

O cedro não tem necessidade de fonte exógena de auxina para a indução do processo de enraizamento, porém a adição destas ao meio de cultura aumentaram a taxa de formação de raízes.

4.4 – Efeito residual do BAP no alongamento e enraizamento de brotações de cedro

A análise estatística revelou uma regressão linear negativa significativa, entre as concentrações de BAP após o período de 30 dias em meio de cultura contendo $3\mu\text{M}$ de GA_3 e a porcentagem de explantes que formaram raízes.

Como pode ser visto na figura 19 a regressão apresentada para o comportamento de explantes de cedro antes da exposição ao ácido giberélico, submetido às diversas concentrações de BAP, mostrou-se cúbica, ao mesmo tempo

que apresentou drástica redução do número de raízes formadas quando adicionado a citocinina ao meio de cultura.

Após o cultivo em GA_3 a retirada da citocinina do meio de cultura, o comportamento da regressão modificou-se, apresentando um aumento no número de raízes produzidas em explantes cultivados em meio com BAP a 1,25 e 2,5 $\mu M.l^{-1}$. No entanto, à concentração de 5 $\mu M.l^{-1}$ de BAP a adição de GA_3 não provocou diferença no número de raízes produzidas.

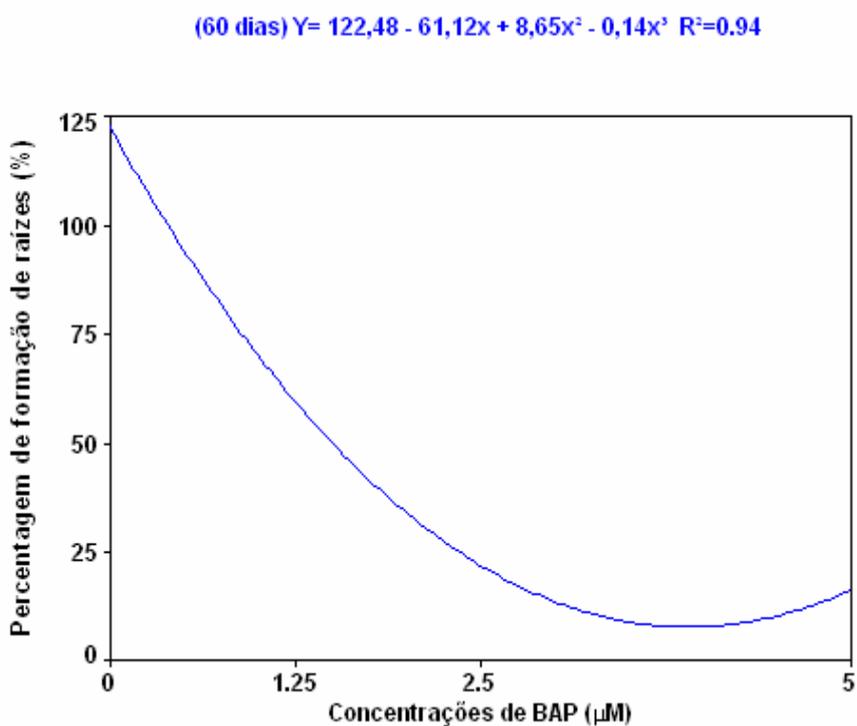


FIGURA 20 – Regressão cúbica para a porcentagem de formação de raízes adventícias em segmentos nodais de cedro aos 60 dias de cultivo em meio WPM e submetidos às diferentes concentrações de BAP.

Em ambos os cultivos (60 e 90 dias), houve efeito das concentrações de BAP adicionadas ao meio, porém com características diferentes. Enquanto que aos 60 dias de cultivo, o efeito das concentrações de BAP mostrou ser cúbico, após a adição de GA_3 , aos noventa dias, o efeito mostrou-se quadrático com a diminuição de raízes apenas quando adicionado 5 $\mu M.l^{-1}$ de BAP (Figura 20).

(90 dias) $Y = 83,75 - 12,55x$ $R^2 = 0,90$

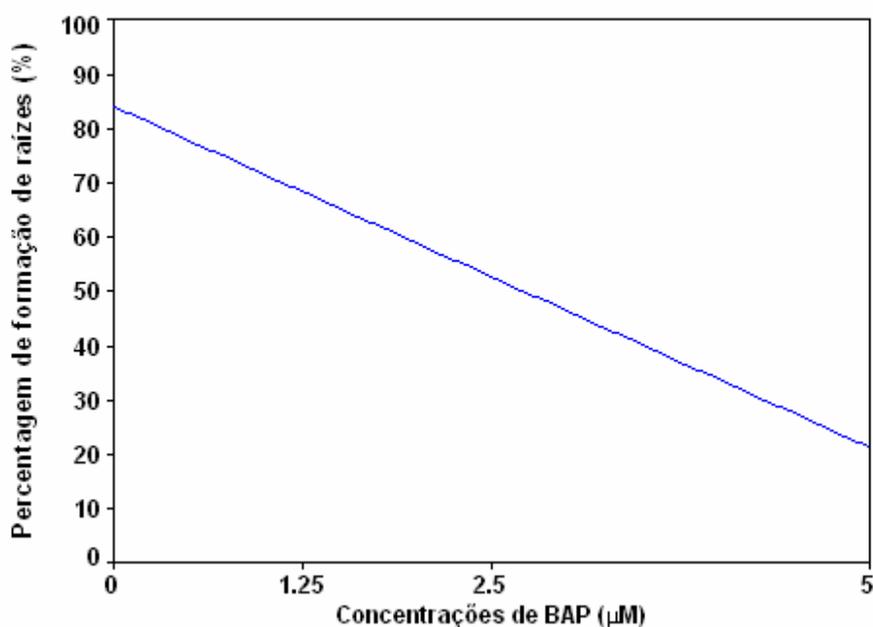


FIGURA 21 – Regressão linear mostrando o efeito residual das diferentes concentrações de BAP às diferentes concentrações sobre a porcentagem de formação de raízes adventícias em segmentos nodais de cedro aos 90 dias de cultivo, em meio WPM adicionado $3\mu\text{M.l}^{-1}$ de GA_3 a e retirados da exposição ao BAP.

Explantos que aos 60 dias apresentaram calos formados em sua base, aos 90 dias, ou seja, após os 30 dias de cultivo exclusivamente na presença de GA_3 e na qual retiradas as citocininas do meio de cultura, induziu a formação das raízes adventícias, sendo que o nível residual de BAP presente em seus tecidos estava diretamente associado às concentrações de BAP usadas no teste anterior.(Figura 21).

O resultado de 80% dos segmentos nodais cultivados formarem raízes demonstra a alta capacidade rizogênica dos tecidos, que certamente ficam inibidos na presença de altas concentrações de BAP. Quando brotações adventícias de *Polygnatum odoratum* foram retiradas do meio MS suplementado com $0,1\text{mg.l}^{-1}$ de AIB e 2mg.l^{-1} ZEA e transferidas para meio de cultura livre de regulador de crescimento, formações de raízes adventícias ocorreram espontaneamente (Yoon & Choi, 2002).

O ANA e o AIB são muitas vezes utilizados nas fases de multiplicação dos explantes para melhorar o crescimento e também para anular o efeito residual das

citocininas, porém sim é usada principalmente na fase de indução do enraizamento (Caldas *et al.*, 1998).

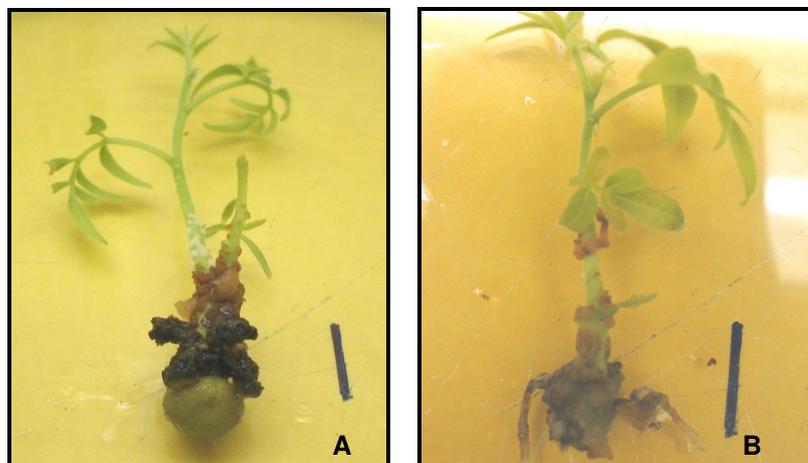


FIGURA 22 – (A) Aspecto de segmentos nodais de cedro aos 60 dias de cultivo em meio WPM suplementado com BAP a $2,5 \text{ M.l}^{-1}$; (B) Aspecto de segmento nodal de cedro cultivado por 30 dias em meio de cultura suplementado com $3\mu\text{M.l}^{-1}$ de GA3 e na ausência da citocinina .

A formação de raízes adventícias em material vegetal cultivado *in vitro* constitui-se a última etapa do processo de regeneração de plantas inteiras a partir de explantes.

Entre as concentrações de BAP e o comprimento médio de brotações de cedro. Aos 60 dias de cultivo, explantes submetidos a concentrações de $1,25$ e $2,5 \mu\text{M.l}^{-1}$ de BAP apresentaram maior comprimento médio ($7,07$ e $1,03$ cm) respectivamente, enquanto que explantes submetidos à concentração de $5\mu\text{M.l}^{-1}$ ou à ausência de citocinina ao meio de cultura apresentaram comprimento médio menores ($0,87$ e $0,91$ cm) respectivamente. Aos 90 dias de cultivo, nós cotiledonares submetidos às concentrações de $1,25$ e $2,5 \mu\text{M.l}^{-1}$ apresentaram comprimento de $1,8$ e $1,17$ cm respectivamente, como pode ser visto na Tabela 10.

TABELA 10 – Comprimento médio de brotações de cedro aos 60 e aos 90 dias de cultivo em meio de cultura WPM suplementado com BAP a diferentes concentrações (60 dias) e com GA₃ a 3 μ M.l⁻¹(90 dias).

Concentração de BAP (μM)	60 dias comprimento (cm)	90 dias(GA₃), comprimento (cm)
0 (μ M)	0,91	1,05
1,25 (μ M)	1,07	1,18
2,5 (μ M)	1,03	1,17
5,0 (μ M)	0,87	0,93
MÉDIA	0,97	1,08

Nesse trabalho ficou evidenciado o efeito residual da citocinina BAP sobre o comprimento médio de brotações e o processo de formação de raízes, onde o GA₃ pôde, em algumas situações reverter o efeito das citocininas sobre proliferação de raízes. O GA₃ favoreceu o desenvolvimento de raízes nas brotações de cedro. De acordo com Kochba *et al.*, (1974), uma hipótese para explicar o efeito do GA₃ no enraizamento é que esse estimula a iniciação de uma zona meristemática radicular.

Para Oliveira *et al.*, (2001), em bilimbi, o meio de cultura contendo um mg.l⁻¹ de GA₃ isoladamente pouco contribuiu para o crescimento de explante aos 30 dias de cultura, sendo que maior desenvolvimento em altura foi obtido aos 60 dias quando o BAP a 1 mg.l⁻¹ estava associado, porém estimulou a formação de calos na base.

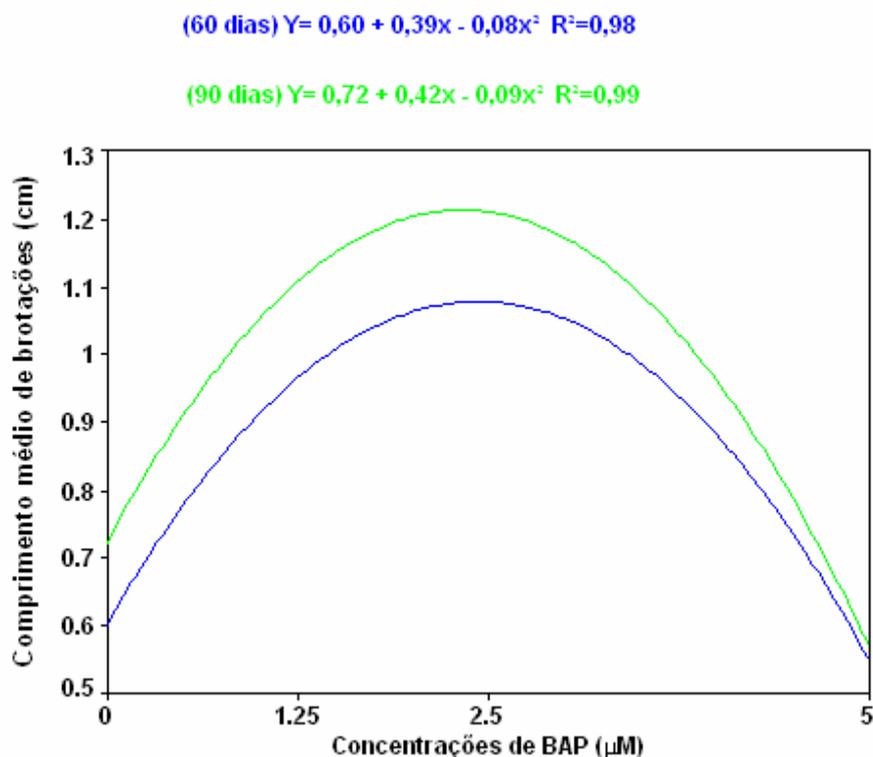


FIGURA 23 – Efeitos residuais dos tratamentos com BAP, combinados no comprimento médio de brotações de *Cedrela fissilis*, aos 60 dias de cultivo e aos 90 dias de cultivo na presença de GA₃.

Segundo Debergh & Read (1991), o alongamento dos eixos caulinares e a redução dos efeitos residuais das citocininas, podem às vezes ser obtidos com a utilização de reguladores de crescimento do grupo das giberilinas. Nesse experimento, porém, quando comparado o efeito residual de BAP sobre o comprimento médio de brotações, verifica-se que houve pouca diferença sobre o alongamento médio de brotações quando cultivados em meio adicionado GA₃ e na ausência da citocinina.

5 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nas diferentes etapas deste estudo, relacionados ao potencial da cultura *in vitro* da espécie *Cedrela fissilis* Vell, permitem as seguintes conclusões:

Para a propagação clonal *in vitro* é possível usar explantes juvenis: provenientes de segmentos nodais de mudas de três anos de idade *ex vitro* e explantes de nós cotiledonares partindo de plântulas *in vitro*.

Uma eficiente assepsia de sementes pode ser obtida pela imersão em álcool 70% por 1 minuto, seguido de hipocorito de sódio a 2% por 10 minutos. Os meios de cultura MS e WPM foram mais favoráveis a sua germinação.

A contaminação bacteriana de segmentos nodais de plantas de 3 anos de idade, pode ser controlada pela inclusão ao meio de cultura de estreptomicina e benlate, ambos a concentrações de 10mg.l^{-1} e 300mg.l^{-1} respectivamente.

A indução de brotações múltiplas e obtenção de plântula completa foi possível em meio de cultura WPM, complementado ou não com BAP em diferentes concentrações (0 ; $1,25$; $2,5$ e $5,0 \mu\text{M.l}^{-1}$) combinado ou não com ANA ou AIB a $0,5\mu\text{M.l}^{-1}$.

A adição de GA_3 ao meio de cultura WPM, possibilitou a formação de raízes na base de explantes submetidos a subcultivos na presença da citocinina BAP.

Os resultados obtidos neste trabalho indicam possibilidades viáveis e concretas que poderão servir de base para futuros estudos de regeneração *in vitro* de cedro (*Cedrela fissilis* Vell)

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, L. B. **Efeito do meio de cultura, tipos de explante e períodos de escuro sobre a micropropagação da batata (*Solanum tuberosum* L.), cv. Cristal.**1998. 60 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 1998.

BECK, S. L.; DUNLOP, R.; STADEN, J. V. Micropropagation of *Acacia mearnsii* from *ex vitro* material. **Plant Growth Regulation**. v. 26, p. 143-148, 1998.

BENNET, I. J.; McCOMB, J. A.; TONKIN, C. M.; MCDAVID, D.A.I. Alternating cytokinins *in multiplication* media stimulates *in vitro* shoot growth and rooting of *Eucalyptus globulus* Labill. **Annals of Botany**, v.74, p.53-58, 1994.

BHOJWANI, S.S.; RAZDAN,M.K. **Plant Tissue Cultura: theory and pratice**, 1996. 767p.

BONGA, J.M. Clonal propagation of mature trees: problems and possible solutions. In: BONGA, J. M.; DURZAN, D. J. **Cell and tissue culture in forestry**. Netherlands: M.Nijhoff, 1987. p.249-271.

BORGES JÚNIOR, N.; SORBOSA, R de., c.; MARTINS-CORDER, M. P. Multiplicação *in vitro* de gemas axilares de acácia-negra (*Acacia mearnsii* De Wild.). **R. Árvore**, v.28, n. 4, p.493-498, 2004.

CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: CALDAS, L. S.; TORRES, A. C.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPH, 1998. V.1.

CALDAS, L. S.; TAKETOMI, C. Desinfestação e controle de oxidação de explantes lenhosos de jabuticabeira e goiabeira para cultura de tecidos. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 5, n. 1, p. 107, jun. 1993.

CARVALHO,P.E. **Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e usos da madeira**. Colombo: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro Nacional de Pesquisa de Florestas, 1998. 640p.

CORDEIRO, I.M.C.; LAMEIRO, O.A.; OHASHI, S.T.; ROSA, L.I. Efeito de BAP sobre a proliferação de brotos *in vitro* de *Schizolobium amazonicum*. Huber ex ducke (paricá).**Cerne**, v. 10, n.1, p.118-124, 2004

CORDER, M. P. M.; BORGES JUNIOR, N. Desinfestação e quebra de dormência de sementes de *Acacia mearnsii* de Wil. **Ciência Florestal**, v. 9, n. 2, p. 1-7, 1999.

COUTO, J.M.F. et al. Desinfestação e Germinação in vitro de sementes de mogno (*Swetenia macrophylla* King). **R. Árvore**, v.28, n.5, p.633-642, 2004.

COSTA, M. P. da; MANTOVANI, W. Composição e estrutura de clareiras em mata primária mesófila na Bacia de São Paulo, SP. **Revista do Instituto Florestal**, v. 4, p. 178-183, 1992. (Edição de Anais do 2º Congresso Nacional sobre Essências Nativas, São Paulo, SP. 1992.)

DAL VESCO, L.L. **Indução e controle da embriogênese somática in vitro na goiabeira serrana (*Feijoa sellowiana* Berg.)**. 1998. 108 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 1998.

DE FOSSARD, R. A. Tissue culture of Eucalyptus. **Australian Forestry**, v.37, p.43-54, 1974.

DEBERGH, P. C., READ, P.E. Micropropagation. In: DEBERGH, P.C., ZIMMERMAN, R. H. **Micropropagation: technology and application**. Dordrecht: Kluwer Academic Press, 1991. p.1-13.

DINIZ, J.D. et al. Ácido giberélico (GA₃) e 6-Benzilaminopurina (BAP) no crescimento in vitro de Macela [*Egletes viscosa* (L.)]. (Comunicação). **Ciênc.Agrotec.**, v.27,n.4,p.934-938, 2003.

ERIG, A. C.; SCHUCH, M. W. Tipo de explante e controle da contaminação e oxidação no estabelecimento in vitro de plantas de macieira (*Malus domestica* Borish) cvs. galaxy, maxigala e mastergal. **R.Bras. Agrociências**, v. 9, n.3, p. 221-227, 2003).

FRANCO, E.T.H. **Embriogênese somática de *Didymopanax morototoni* (Aubl.) DCNE & PLANCH.** 2000. 125 f. Tese (Doutorado em Botânica). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2000.

FRANCO, E.T.H., FERREIRA, A. G. Tratamentos pré-germinativos em sementes de *Didymopanax morototoni*. **Ciência Floresta**, v. 12, n. 1, 2002.

GAMBORG, O. L., SHYLUK, J.P. Nutrition, media and characteristics of plant cell and tissue cultures. In: THORPE, T.A. **Plant tissue Culture: methods and applications in agriculture**. New York: Academic Press, 1981.p.1-44.

GAMBORG, O. L.; MILLER, R. A.; OJIMA, K. Nutrient requirements os suspension cultures of soybean root cells. **Experimental Cell Research**. v. 50, p. 151-158, 1968.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture: the technology**. Great Britain: Exegetics Limited, 1993. v.1 547p.

GRATTAPAGLIA, D. & MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C., CALDAS, L. S., BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-CNPq, v.1, 1998, p.183-260.

GUERRA, M. P. Giberelinas In: Kerbany, G. B. **Fisiologia Vegetal**. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 2004. 452p.

HARTMANN, G.G. et al. Principles of tissue culture for micropropagation. In: **Plant propagation: principles and practices**. 6 ed. New Jersey: Prentice Hall, 1997. p.549-589.

HIGASHI, E. N.; SILVEIRA, R.L.V.A.; GONÇALVES, A.N. **Propagação vegetativa de Eucalyptus: princípios básicos e sua evolução no Brasil**. Piracicaba: IPEF, 2000. 12p. (Circular Técnica, n.192).

HU, C. Y.; WANG, P.J. Meristem, shoot tip and bud cultures. In: EVANS, D.A. et al. **Handbook of plant cell culture**. New York: MacMillan Publishing Company, 1983. v.1, p. 177-227.

KALIL FILHO, A. N. et al. A Micropropagação do mogno (*Swietenia macrophylla*): desinfestação e germinação. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE ECOSISTEMAS FLORESTAIS – FOREST 2000, 6., 2000. Porto Seguro. **Anais...** Porto Seguro: [s.n.], 2000. p. Bio1013.

KIRBY, E.G; LEUSTEK, T; LEE, M.S. Nitrogen Nutrition. In: BONGA, J.M & DURZAN, D.J. **Cell and Tissue Culture in Forestry**. General Principles and Biotechnology. 1994. v.1

KIRST,M & SEPEL,M.M.N. Micropropagação de Cedrella fissilis Vellozo a partir de ápices de plântulas. In: SIMPÓSIO SOBRE ECOSISTEMAS NATURAIS DO MERCOSUL, 1., 1996, Santa Maria. **Anais...**Santa Maria. Universidade Federal de Santa Maria,1996. p.119-126.

KOCHBA, J. et al. Stimulation of rooting of citrus embryogenesis by giberelic acid and adenine sulphate. **Annual Botany**, v.38,p.795-802,1974.

KRYVENKI, M.A.; ANGEL, M. Micropropagation de la yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.): Efecto de la bencilaminopurina y la kinetina sobre el cultivo *in vitro* de segmentos nodales In: CONGRESSO SUL-AMERICANO DA ERVA – MATE, 1., 1995, Porto Alegre ; REUNIÃO TÉCNICA DO CONE SUL SOBRE A CULTURA DA ERVA MATE, 2., 1995, Porto Alegre **Anais...** Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1995. p.424.

LLOYD, G., McCOWN, B.Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia* by use of shoot-tip cultura. **Comb.Proc.Intl.Plant.Prop.Soc.**, v.30, p. 421-427,1980.

LO, O. F., CHEN, C.J. & ROSS, J.G. Vegetative propagation of temperate foliage grasses through callus culture. **Crop. Sci.**, v. 20, n.363-7,1980.

MANTOVANI, N. C. **Estudo da regeneração *in vitro* de caixeta *Didymopanax morototoni* (Aubl.Dcne. et Planch)**. 1997. 106 f. Dissertação (mestrado em Engenharia Florestal). Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 1997.

MANTOVANI,C.M; FRANCO,E.T.H; VESTENA,S. Regeneração *in vitro* de louro-pardo (*Cordia trichotoma* Vellozo). **Ciência Florestal**, v.11, n.2, p.93-101.

MARTIN, C. **Plant breeding *in vitro***. Endeavour, 1985. P.81-86. (New series, 9)

MARTIN,S.M., ROSE, D. Growth of plant cell (Ipomea) suspension cultures at controlled pH levels. **Can.J.Bot.**, v.57, p.126-1270, 1976.

MARUYAMA E. et al. .Micropropagation of cedro (*Cedrela odorata* L.) by shoot-tip culture. **J. Jpn. For. Soc.** v.71,p. 329–331, 1989

MELO de, M.F., OKASAKI, W.Y., LEITE, C.Y & FÁRI, M. Estabelecimento do cultivo *in vitro* de aceroleira (*Malpighia emarginata* DC). **Ciênc. e Agrotec.**, v.23,n.1,p-102-107,1999.

MERCIER, H.; KERBAUY, G.B. Effects of nitrogen source on growth rates and levels of endogenous cytokinins and chlorophyll in protocorms of *Epidendrum fulgens*. **Journal of Plant Physiology**, v.138, p.195-199, 1991.

MODGIL, M.; SHARMA, D.R.; BHARDWAJ, S.V. Micropropagation of apple cv. Tydemans Early Worcester. **Scientia Horticulturae**, v.81, p.179-188, 1999.

MONTARROYOS, A.V.V. Contaminação *in vitro*. **ABCTP Notícias**, n.36/37, p.5-10, 2000.

MORENO, M. I. C. Cultura *in vitro* de *Cedrela fissilis*. In: CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA, 46., 1995, Ribeirão Preto. **Resumos**. Ribeirão Preto: FFCLRP: Universidade de São Paulo, 1995. p. 273.

MROGINSKI, L.A & ROCA, W.M. Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales *in vitro*. In: ROCA, W.M.; MROGINSKI, L.A. **Cultivo e tejidos em la agricultura: fundamentos y aplicaciones**. Cali: CIAT, 1991. P.1940.

MURASHIGE, T. Plant propagation through tissue culture. **Ann. Rev.Plant. Physiol.**, v.25, p.135-166, 1974.

MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A Revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, v.15, n.3, p.473-497,1962.

NUNES, E.C et al.. *In vitro* culture of *Cedrela fissilis* (Meliaceae). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** v.70, p. 259-268, 2002.

OLIVEIRA, A.K.D; ROCHA,R.H.C; OLIVEIRA,O.F; CÂMARA,F.A.A. Multiplicação in vitro do Bilimbi utilizando-se diferentes concentrações de reguladores de crescimento. **Caatinga**, v.14, n.1/2, p. 37-41, 2001.

PAIVA, H. N., GOMES, J. M. **Propagação vegetativa de espécies florestais**. Viçosa: SIF, 1995, 40 p. (Boletim, n. 322)

PATNAIK, J.; DEBATA, B.K. Micropropagation of *Hemidesmus indicus* (L.) R. Br. Through axillary bud culture. **Plant Cell Report**, v. 15, p.427-430, 1996.

PERRANDO, E.R. **Propagação vegetativa de acácia-negra (*Acacia mearnsii* De Wild.)**. 2003. 123 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2003.

PIERIK, R. L. M. ***In vitro* culture of higher plants**. Netherlands: Martinus Nijhoff, 1987. 344p.

PREECE, J. E. Can nutrient salts partially substitute for plant growth regulator? **Plant tissue culture and biotechnology**, v. 1, n. 1, p.26-37, 1995.

RAJASEKARAN, P. Production of clonal plantlets of *Grevillea robusta* in *in vitro* culture via axillary bud activation. **Plant Cell Tissue organ Cult.**, v.39, p.277-279, 1994.

REITZ, R., KLEIN, R. M., REIS, A. **Projeto madeira do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: Secretaria de Agricultura e Abastecimento, 1983.524p.

RIBAS, L. L.; ZANETTE, F.; KULCHETSCKI.; GUERRA,M. P. Micropropagação de *Aspidosperma polyneuron* (peroba-rosa) a partir de segmentos nodais de mudas juvenis. **Revista Árvore**, v. 9, n.4, p. 517-524, 2005.

RIBAS, L. L.F. **Morfogênese *in vitro* e micropropagação de *Aspidosperma polyneuron* Müll. Arg. (peroba-rosa)**. 1999. 175 f. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal) Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1999.

SANSBERRO, P.A. et al. Regeneración de yerba mate por cultivo *in vitro* de segmentos uninodales de plantas jóvenes. In: CONGRESSO SUL-AMERICANO DA ERVA –MATE, 1., 1995, Porto Alegre ; REUNIÃO TÉCNICA DO CONE SUL SOBRE A CULTURA DA ERVA MATE, 2., 1995, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1995.p.423

SATO, Y,A. *et al.* Micropropagação de *Celtis* sp: controle da contaminação e oxidação. **Revista Cerne**, v.7, n.2,p. 117-123,2001.

SILVA, B.A., PASQUAL, M; MACIEL, A.L.R., MOREIRA, M.A., DUTRA, L.F. Influência da benzilaminopurina e do benomyl na proliferação *in vitro* de abacaxizeiro. **Ciênc.Agrotec.** v.26, n.6, p.1190-1196, 2002.

SILVA, L.C. ET AL. Efeito da iluminação e da pré-lavagem dos ramos no estabelecimento *in vitro* de mirtilo, cv,Florida, Pelotas, RS, 2004. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 13., ; ENPOS, 4., 2004, Pelotas. **Anais...** Pelotas: Universidade Federal de Pelotas, 2004.

SKOOG, F. & MULLER, C. O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. **Symposium of Society of Experimental biology**, v.11, n.118-131, 1957.

SMITH, R.H. Plant **Tissue Culture. Techniques and Experiments.** San Diego: Academic Press, 1992, 171p.

SOUZA de, P.B.L. et al. Germination *in vitro* of seeds of a threaten arboreal specie in the municipal district of Araíba (BA). **Sitientibus**, n.20, p.89-99, 1999.

TAIZ, L., & ZIEGER. **Fisiologia vegetal.** Porto Alegre: ARTMED, 2004. 719p.

TRINDADE,H. et al. The rolo os cytokinin in rapid multiplication of shoots os Eucalyptus globulus grown *in vitro*. **Aust. For.**, v. 53, n.3, p. 221-223,1990.

VON ARNOLD, S., ERIKSON, T. *In vitro* studies of adventitious roots formation in *Pinus contorta*. **Can.J.bot.**, n.59,p. 870-874, 1981.

YOON,E & CHOI,Y. Micropropagation and Mass Production of Adventitious Roots of *Polygonatum odoratum* via Culture of Seedling Explants. **J.Plant.Biotechnology**, v.4, p.33-37, 2002.